



Title	EBウイルス(EBV)産物Latent Membrane Protein 1(LMP1)のB細胞活性化・分化に対する影響
Author(s)	内田, 純二
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41718">https://hdl.handle.net/11094/41718</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	うちだ じゅんじ 内田 純 二
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 14471 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学位論文名	EBウイルス(EBV)産物 Latent Membrane Protein 1 (LMP1) のB細胞活性化・分化に対する影響
論文審査委員	(主査) 教授 菊谷 仁  (副査) 教授 平野 俊夫 教授 仲野 徹

#### 論文内容の要旨

##### 【目的】

Epstein-Barr virus (EBV) がヒトB細胞に感染するとウイルス由来蛋白の発現誘導, さらにB細胞の形質転換が誘導される。EBVにより形質転換したB細胞は幼弱化と共に, 活性化マーカー及び細胞接着因子等の発現が増強し, 抗体産生を行うようになる事が知られているが, これらの一連の細胞反応はCD40リガンドやマイトージェン等によるB細胞分化過程と類似している。B細胞の形質転換にはEBV由来のLMP1が必須であるが, その細胞内領域にTNF-receptor-associated factors (TRAFs) が介合すること, B細胞に発現したLMP1は細胞膜上で凝集する事によって持続的にNF- $\kappa$ Bを活性化し, 活性化マーカーを発現誘導することが知られている。以上の知見よりLMP1はTNF receptorのファミリーの一員であるCD40のシグナル伝達経路を利用してB細胞を形質転換している可能性が推測されている。本研究では, LMP1トランスジェニックマウス(LMP1 tg)及び, LMP1トランスジェニックCD40欠損マウス(LMP1 tg/CD40KO)のB細胞機能及び液性免疫能を解析し, *in vivo*におけるLMP1とCD40シグナルを比較検討した。

##### 【方法ならびに成績】

LMP1 tgはNancy Raab-Traubから作成, 分与された。トランスジーンとしてIgH鎖のプロモーター, エンハンサーの下流にLMP1のcDNAを連結した構築を用い, 発現させたものである。CD40KOは以前当研究室において作成, 系統維持されたものを実験に供した。マウスはすべてC57BL/6に戻し交配し, MHCがH-2<sup>b</sup>である事を確認した。

LMP1 tgの脾細胞をフローサイトメトリーにて解析したところ, LMP1 tg B細胞上で, CD23, Fas, ICAM-1等の活性化マーカーの発現が有意に上昇していた。次にLMP1のB細胞活性化への影響をその増殖能や抗体産生能を指標に検討した。正常B細胞にIgG産生を誘導するにはIL-4に加えCD40の刺激が必要であったが, LMP1 tg由来のB細胞は非刺激下あるいはIL-4刺激のみで有意なIgM産生, IgG1産生, 増殖反応を示した。*In vitro*においてLMP1はB細胞に活性化や分化を誘導し, その誘導はCD40シグナルによるものと類似する事が明らかとなった。

*In vivo*でもLMP1がCD40シグナルを代替できるかを検討するため, LMP1 tg/CD40KOを4-hydroxy-3-

nitrophenyl acetyl-chicken  $\gamma$ -globulin (NP-CGG) で免疫し、抗体産生能及び産生抗体の親和性を ELISA にて解析した。LMP1 tg/CD40KO において IgG1 にクラススイッチした抗体の産生を認めた。しかし、LMP1 tg/CD40KO の血清では、コントロールマウスや LMP1 tg に比して、高親和性抗体が著明に減少していた。すなわち LMP1 は CD40 と同様に、Ig クラススイッチを誘導するが、抗体の親和性増大には寄与しない事が示唆された。

次に NP-CGG 免疫後の脾臓切片を免疫組織学的に染色し、解析した。Igh<sup>b</sup> アロタイプを有するマウスにおいて、NP ハプテンに対する抗体は L 鎖として  $\lambda$  1 鎖を優先的に利用する事が知られている。免疫後 7 日目の CD40KO の T 細胞領域 (小動脈周囲リンパ球鞘, PALS) には  $\lambda$  陽性の B cell foci が形成されるが抗 IgG1 抗体で染色されないのに対し、LMP1 tg/CD40KO の B cell foci は LMP1 tg やコントロールマウスと同じく、IgG1,  $\lambda$  陽性細胞が認められた。また、14 日目のコントロールマウスにおいては典型的な胚中心 (GC) 形成が認められ、LMP1 tg/CD40KO や LMP1 tg においては GC 形成は認められなかった。この結果より、LMP1 tg からのシグナルは、CD40KO マウスでは消失したクラススイッチを伴った PALS における B 細胞分化をレスキューするが、GC 形成を抑制する事を示している。

#### 【総括】

LMP1 のシグナルが CD40 の作用の一部を利用し、T 細胞領域での B 細胞活性化・分化を誘導するが、一方では逆に、GC 形成を阻害する事が示された。

この結果は、EBV に感染した B 細胞がリンパ芽球化し、CD23 を強発現し、抗体を産生する事、CD23 陰性で組織学的にも GC の centrocyte の形態を持つ EBV 陽性バーキットリンパ腫が LMP1 を発現していないという事実と一致する。EBV が急性感染する際にはリンパ濾胞外 (T 細胞領域) で活性化・分化する B 細胞に感染・増幅する事が、EBV の感染成立に寄与しているものと考えられる。一方で、EBV はメモリー B 細胞で潜伏感染している事が最近報告されているが、リンパ濾胞外の感染 B 細胞においても、LMP1 の発現を失ったものは GC における分化段階を経て、メモリー B 細胞の形質を獲得し、潜伏感染を成立させている可能性も考えられる。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒトにリンパ腫を発生させる Epstein-Barr virus (EBV) の、B 細胞感染時に発現される必須の B 細胞形質転換因子である Latent Membrane Protein 1 (LMP1) に関して、その機能を解析するために、LMP1 を B 細胞特異的に発現させた transgenic マウスを、LMP1 がその細胞内のシグナル伝達経路の一部を共有していると推測される CD40 のノックアウトマウスのバックグラウンド下にて解析したものである。本研究から LMP1 は、EBV の感染時に CD40 シグナルと同様に、B 細胞を活性化、増殖、リンパ濾胞外での抗体クラススイッチを含む分化を誘導する働きがある事が判明した。しかし、CD40 シグナルとは異なり、胚中心を経由してメモリー B 細胞等に分化する方向に対しては LMP1 は阻害的に働く事が判明した。従って本研究は、EBV の形質転換因子である LMP1 が正常シグナル伝達機構をいかに利用しているかを明らかにしたもので、EBV の B 細胞感染成立及び、潜伏感染の機構を明らかにする上で重要な知見と考えられ、十分学位に値するものである。